

HPLC法快速测定吉米沙星尿药浓度及其尿排泄研究

何秋毅^{1*},任 斌^{1#},元 刚¹,叶毅芳¹,洪晓丹¹,陈 杰¹,傅晓华²(1.中山大学附属第一医院,广州 510080;2.广州新海医院,广州 510300)

中图分类号 R969.1;R978.1⁹ 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)10-0891-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.10.10

摘要 目的:建立快速测定人尿液中吉米沙星药物浓度的方法,并考察其尿排泄情况。方法:尿样用甲醇处理后以高效液相色谱法测定,色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为乙腈-10 mmol/L 醋酸铵缓冲液(pH 2.2,含10 mmol/L 高氯酸)(22:78, V/V),柱温为40 ℃,流速为1.5 ml/min,检测波长为338 nm。结果:吉米沙星尿药浓度在0.1~100 μg/ml范围内线性关系良好($r=0.999\ 3$),最低检测质量浓度为0.05 μg/ml;平均方法回收率为93.0%~102.7%,平均提取回收率为103.2%~109.4%,日内RSD为1.3%~5.7%,日间RSD为5.3%~9.5%。国产及进口吉米沙星片48 h尿累积排泄率分别为(37.4±7.5)%和(41.2±14.0)%。结论:本方法简便、快速、灵敏、重现性好,适用于吉米沙星尿药浓度测定。

关键词 吉米沙星;尿药浓度;高效液相色谱法;药动学

Rapid Determination of Gemifloxacin in Urine by HPLC and Study on Excretion of It by Urine

HE Qiu-yi¹, REN Bin¹, YUAN Gang¹, YE Yi-fang¹, HONG Xiao-dan¹, CHEN Jie¹, FU Xiao-hua²(1. The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Guangzhou Xinhai Hospital, Guangzhou 510300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for rapid determination of gemifloxacin in human urine and to investigate the excretion of gemifloxacin by urine. METHODS: HPLC method was adopted to detect urine sample after treated with methanol. The determination was performed on Kromasil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate buffer(pH 2.2, containing 10 mmol/L perchloric acid, 22:78, V/V) at flow rate of 1.5 ml/min. The column temperature was 40 ℃, and detection wavelength was set at 338 nm. RESULTS: The linear range of gemifloxacin in urine were 0.1-100 μg/mL ($r=0.999\ 3$); the lowest detection limit was 0.05 μg/ml with average method recoveries of 93.0%-102.7% and extraction recoveries of 103.2%-109.4%; RSD of intra-day and inter-day were 1.3%-5.7% and 5.3%-9.5%, respectively. Accumulative excretion rates of domestic and imported Gemifloxacin tablet by urine within 48 h were (37.4±7.5)% and (41.2±14.0)%, respectively. CONCLUSIONS: The method is found to be convenient, rapid, sensitive and reproducible for the determination of gemifloxacin in urine.

KEYWORDS Gemifloxacin; Urine concentration; HPLC; Pharmacokinetics

甲磺酸吉米沙星是由韩国LG生命科学有限公司1994年开发的第4代氟喹诺酮类抗菌药,2003年被美国FDA批准上市。吉米沙星主要通过抑制细菌DNA的螺旋酶和拓扑异构酶IV而表现出杀菌活性,在体外对许多病原菌有极好的抗菌活性,在体内对呼吸系统和泌尿道相关的革兰阳性、阴性菌和非典型性病原体有效^[1]。吉米沙星为浓度依赖性抗菌药,其尿药浓度与吉米沙星治疗泌尿道感染的疗效相关。本研究建立了快速测定吉米沙星尿药浓度的高效液相色谱(HPLC)法,该方法简单、迅速、准确,用于吉米沙星尿药浓度测定及尿排泄研究,为临床研究提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters高效液相色谱仪,包括600型低压梯度泵、717型自动进样器、486型紫外检测器、Millennium32色谱工作站(美国Waters公司);QL-901涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);3K18高速冷冻离心机(美国Sigma公司);AG245

电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);3-Star pH计(美国Orion公司);Milli-Q超纯水装置(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

甲磺酸吉米沙星对照品(丽珠医药集团股份有限公司,批号:QUB05008,含量:99.4%);内标甲磺酸妥舒沙星(赤峰万泽制药有限责任公司,批号:20081102);国产甲磺酸吉米沙星片(丽珠医药集团股份有限公司提供,规格:每片320 mg,批号:090327);进口吉米沙星片(韩国LG生命科学有限公司,规格:320 mg/片,批号:FAT08021);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-10 mmol/L 醋酸铵缓冲液(pH 2.2,含10 mmol/L 高氯酸)(22:78, V/V);柱温:40 ℃;流速:1.5 ml/min;检测波长:338 nm。在该色谱条件下,尿样中内源性杂质均不影响吉米沙星和内标物的分离测定,吉米沙星与内标保留时间分别为8.8 min和9.9 min。空白尿样及尿样品色谱图见图1。

2.2 尿药浓度测定

2.2.1 吉米沙星标准溶液配制。准确称取甲磺酸吉米沙星

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:020-87755766-8430。

E-mail:pharma_h@sohu.com

通信作者:副主任药师,硕士研究生导师。研究方向:临床药学。电话:020-87755766-8420。E-mail:renbinsys@sina.com

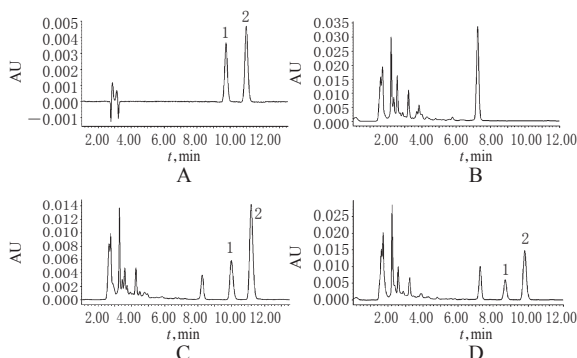


图1 高效液相色谱图

A. 标准溶液; B. 空白尿样; C. 空白尿样加入吉米沙星对照品(4 μg/ml)和内标溶液; D. 健康受试者口服吉米沙星4~6 h尿样; 1. 吉米沙星; 2. 妥舒沙星

Fig 1 HPLC chromatograms

A. standard solution; B. blank urine; C. blank urine spiked with gemifloxacin control (4 μg/ml) and internal standard; D. urine sample 4-6 h after oral administration of gemifloxacin; 1. gemifloxacin; 2. tosofloxacin

对照品适量,置于10 ml量瓶中,加入适量甲醇溶解并定容,得质量浓度为1 000 μg/ml的吉米沙星标准溶液;再依次稀释,配成质量浓度分别为1、2、5、10、40、50、100、500、800 μg/ml的吉米沙星标准溶液。

2.2.2 内标溶液。取甲磺酸妥舒沙星对照品适量,置于10 ml量瓶中,加入适量甲醇溶解并定容,得质量浓度为1 000 μg/ml的妥舒沙星贮备液;以甲醇稀释成125 μg/ml的内标溶液。

2.2.3 尿样处理与测定。精密吸取尿样100 μl,置于1.5 ml离心管中,加入内标溶液10 μl,涡旋混合1 min后加入甲醇100 μl,涡旋1 min;以离心半径为8 cm,10 000 r/min离心10 min,取上清液20 μl进样。记录色谱图,以吉米沙星峰面积(A_1)与内标峰面积(A_2)之比(y)代入标准曲线计算吉米沙星尿药浓度。

2.2.4 标准曲线的制备。精密吸取空白尿样100 μl,置于1.5 ml离心管中,分别加入不同质量浓度的吉米沙星标准溶液10 μl,混匀,使尿药浓度分别为0.1、0.5、1、5、10、50、100 μg/ml。按“2.2.3”项方法操作,记录色谱图,以 A_1 和 A_2 的比值 y 为纵坐标,吉米沙星质量浓度(c)为横坐标,用加权(权重系数 $w=1/c^2$)最小二乘法进行回归运算。求得直线回归方程为: $y=0.0938c-0.0015$ ($r=0.9993$)。结果表明,吉米沙星尿药浓度在0.1~100 μg/ml范围内线性关系良好,以信噪比为3:1计,吉米沙星的最低检测质量浓度为0.05 μg/ml。

2.2.5 回收率试验。分别于100 μl空白尿样中加入低、中、高3种质量浓度的吉米沙星标准溶液10 μl,涡旋混匀1 min,使尿药浓度分别为0.2、4、80 μg/ml。按“2.2.3”项方法操作,记录色谱图,将吉米沙星峰面积(A_1)与 A_2 之比 y 代入标准曲线计算吉米沙星尿药浓度,以测得值与加入值之比计算方法回收率。另制备吉米沙星等质量浓度标准溶液,依前述方法分析,得吉米沙星峰面积为 A_2 ,依 $(A_1/A_2) \times 100\%$ 计算提取回收率。结果详见表1。

2.2.6 精密度试验。制备含吉米沙星质量浓度分别为0.2、4、80 μg/ml的尿样为质控样品,共做3批,每批每个质量浓度做5份样品。按“2.2.3”项方法操作,记录色谱图,计算吉米沙星峰面积 A_1 和内标峰面积 A_2 的比值 y ,将比值 y 代入标准曲线方程计算吉米沙星尿药浓度,计算日内RSD为1.3%~5.7%,日间

表1 回收率及精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of recovery and precision tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入值, μg/ml	实测值, μg/ml	提取回收率, %	方法回收率, %	日内RSD, %	日间RSD, %
0.2	0.19±0.02	109.4±9.4	93.0±8.4	5.7	9.5
4	4.1±0.1	103.7±1.5	101.6±1.8	1.3	8.6
80	82.1±1.3	103.2±1.1	102.7±1.6	1.4	5.3

RSD为5.3%~9.5%。结果详见表1。

2.2.7 稳定性考察。制备含吉米沙星质量浓度分别为0.2、4、80 μg/ml的质控样品,于室温(22~25 ℃)放置6 h、-37 ℃冻融3次、-37 ℃放置12周后,按“2.2.3”项方法操作,考察吉米沙星稳定性。结果低、中、高3种质量浓度的吉米沙星质控尿样在三种条件存放后尿药浓度偏差分别为-0.3%~3.5%, 0.0%~2.8%, -5.0%~6.0%。另考察尿样提取液于室温(22~25 ℃)放置16 h后偏差为0.0%~2.0%。说明尿样中吉米沙星在上述保存条件下保持稳定。稳定性试验结果见表2。

表2 稳定性试验结果(μg/ml, $\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Results of stability tests(μg/ml, $\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度	室温稳定性	冻融稳定性	长期稳定性
0.2	0.20±0.02	0.20±0.01	0.19±0.02
4	4.14±0.11	4.11±0.05	3.86±0.05
80	79.78±0.65	80.57±1.17	84.82±1.91

2.3 尿排泄研究

22名健康受试者,分别空腹口服国产甲磺酸吉米沙星片320 mg或进口吉米沙星片320 mg,服药后2 h可饮水,4 h统一进清淡饮食。分段收集服药前与服药后0~<2 h、2~<4 h、4~<6 h、6~<8 h、8~<12 h、12~<24 h、24~<36 h、36~<48 h时的尿液,每段尿液分别充分混合,测量其体积并测定其中吉米沙星药物浓度。1周后交叉服药。按如下公式分别计算尿累积排泄率(Urine excretion, UE)和尿排泄速率(Urine excretion rate, UR)。

$$UE = \frac{\sum_{i=1}^n C_i V_i}{\text{Dose}} \times 100$$

$$UR = \frac{C_i V_i}{\tau}$$

式中, C_i 为服药后某时间段 τ 的尿药浓度, V_i 为服药后某时间段 τ 的尿样体积, τ 为取样间隔,Dose为服药剂量。

结果显示,国产及进口吉米沙星片48 h UE差异无统计学意义,分别为(37.4±7.5)%和(41.2±14.0)%;服药后0~<2 h UR最大,国产及进口吉米沙星片分别为(12.3±5.1)mg/h和(15.7±5.8)mg/h,二者差异无统计学意义。吉米沙星UE(A图)与UR(B图)曲线见图2。

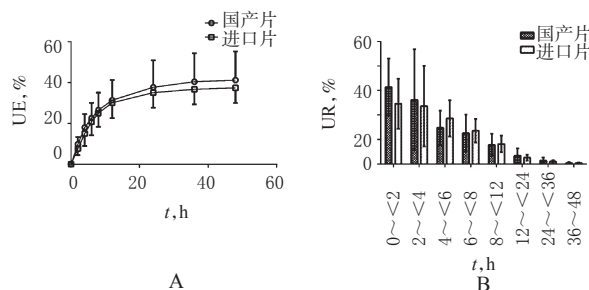


图2 22名健康志愿者口服吉米沙星片320 mg后UE及UR曲线
Fig 2 UE and UR curves of gemifloxacin in 22 healthy volunteers after oral dose of Gemifloxacin tablet 320 mg

盐酸美金刚片在健康人体内的药动学研究

张学明*(天津市蓟县中医医院,天津 301900)

中图分类号 R969.1;R749.1*6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)10-0893-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.10.11

摘要 目的:研究单次给予盐酸美金刚片在健康人体内的药动学。方法:选取20名健康受试者,分别单次口服低(10 mg)、高(20 mg)剂量组的盐酸美金刚片后采用液-质联用法进行血药浓度测定。色谱柱为Hedera ODS-C₁₈,流动相为20 mmol/L醋酸铵水溶液(含0.05%的甲酸)-甲醇(47:53),流速为0.45 ml/min,柱温为38 ℃,进样量为5 μl。选择性离子检测(SIM),检测对象为美金刚,[M+H]⁺离子,*m/z* 180.2;内标(多奈哌齐),[M+H]⁺离子,*m/z* 380.3。结果:单次口服盐酸美金刚片10 mg和20 mg后,主要药动学参数分别为 c_{\max} (13.64±3.12)、(29.18±5.97)ng/ml, t_{\max} (7.8±2.6)、(8.0±4.6)h, $t_{1/2}$ (60.5±7.3)、(67.1±9.4)h, $AUC_{0-288\text{h}}$ (1 110.4±353.2)、(2 605.5±432.1)ng·h/ml。结论:低、高剂量组消除半衰期及达峰时间相近, $AUC_{0-288\text{h}}$ 、 c_{\max} 均与剂量基本呈正比递增关系,无性别差异。

关键词 盐酸美金刚;液-质联用法;药动学

Pharmacokinetic Study of Memantine Hydrochloride Tablet in Healthy Volunteers

ZHANG Xue-ming(Tianjian Jixian County Hospital of TCM, Tianjin 301900, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the blood concentration and pharmacokinetic parameters of single dose of Memantine hydrochloride tablets in healthy volunteers. **METHODS:** 20 healthy subjects were selected and given low-dose (10 mg) and high-dose (20 mg) Memantine hydrochloride tablets, respectively. LC-MS method was adopted to determine the blood concentration of drugs. The determination was performed on Hedera ODS-C₁₈ column with mobile phase consisted of 20 mmol/L ammonium acetate (containing 0.05% formic acid)-methanol (47:53) at the flow rate of 0.45 ml/min. The column temperature was 38 ℃, and sample size was 5 μl. MS detection condition was as follows: selective ion measurement (SIM), memantine as detection object, [M+H]⁺ ion, *m/z* 180.2; donepezil as internal standard, [M+H]⁺ ion, *m/z* 380.3. **RESULTS:** After single oral dose of Memantine hydrochloride tablets (10 mg and 20 mg), main pharmacokinetic parameters were as follows: c_{\max} was (13.64±3.12) ng/ml and (29.18±5.97) ng/ml; t_{\max} was (7.8±2.6) h and (8.0±4.6) h; $t_{1/2}$ was (60.5±7.3)h and (67.1±9.4)h; $AUC_{0-288\text{h}}$ was (1 110.4±353.2) ng·h/ml and (2 605.5±432.1) ng·h/ml. **CONCLUSIONS:** The elimination half life and peak time of low-dose group are close to those of high-dose group. The dose increases progressively with $AUC_{0-288\text{h}}$, c_{\max} proportionally. There is no gender difference.

KEYWORDS Memantine hydrochloride; LC-MS; Pharmacokinetics

3 讨论

22名健康志愿者分别口服国产及进口吉米沙星片后,48 h UE分别为(37.4±7.5)%和(41.2±14.0)%;与文献报道的中国健康受试者单次空腹口服吉米沙星320 mg后48 h内平均累积尿排出率(37.84±6.62)%^[2]相近。说明吉米沙星给药量的约40%以原型药物经肾排出。

在动物和人体的研究显示,吉米沙星 c_{\max} /最低抑菌浓度(MIC)与细菌清除率和预防耐药性的产生呈正相关。吉米沙星 c_{\max} /MIC>10时,可有效清除革兰阴性菌并预防耐药性的产生^[3-5]。吉米沙星服药后0~<2 h UR最大,国产及进口吉米沙星片服用后尿液中峰浓度分别为(144.3±124.4)μg/ml和(108.1±36.5)μg/ml。文献报道的泌尿道常见革兰阴性致病菌(大肠杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、粪肠球菌)对吉米沙星的MIC值分别为0.06、0.125、1、0.5 μg/ml。本研究吉米沙星尿药峰浓度是泌尿道革兰阴性致病菌MIC值的10倍以上,提

示吉米沙星用于敏感菌引起的泌尿道感染有较好的疗效。

参考文献

- [1] 李然,王睿.新一代广谱氟喹诺酮类抗菌药物吉米沙星[J].中国抗生素杂志,2008,33(8):453.
- [2] 曹国英,张菁,郁继诚,等.单剂口服吉米沙星临床药理学研究[J].中国感染与化疗杂志,2009,9(5):334.
- [3] 钱嫣蓉,周敏,万欢英.新喹诺酮类抗生素药代/药效学在下呼吸道感染中的应用[J].上海医学,2005,28(12):1 054.
- [4] 陈雪华.氟喹诺酮类药物的药动学和药效学[J].中华医学信息导报,2004,19(10):20.
- [5] Firsov AA, Zinner SH, Lubenko IYu, et al. Gemifloxacin and ciprofloxacin pharmacodynamics in an in-vitro dynamic model: prediction of the equivalent AUC/MIC breakpoints and doses[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2000, 16(4):407.

*副主任药师。研究方向:医院药学。电话:022-29191097。E-mail:zxm_2010@163.com

(收稿日期:2013-08-09 修回日期:2014-01-08)